

## El papel de la proteómica en la definición del secretoma embrionario humano\*

MG Katz Jaffe, S McReynolds, DK Gardner, WB Schoolcraft

*Actualmente se ha insistido en la necesidad de la selección embrionaria, no sólo para transferir embriones con mejores posibilidades de implantación. Los llamados “omics” –entre los cuales se cuentan los “proteomics”– nos permiten lograr una mejor selección embrionaria no invasiva, además de conocer más sobre los procesos celulares del embrión. Esta tecnología aún está en desarrollo, y aunque son alentadoras las posibilidades, es importante tomar en cuenta que son muchas las proteínas implicadas. Además de conocer sus productos, es importante establecer sus correlaciones e interacciones para poder establecer un modelo que nos lleve a un factor de predicción adecuado.*

### RESUMEN

La evaluación no invasiva de gametos y embriones se considera un aspecto importante en la tecnología de reproducción asistida. Actualmente, la selección de embriones para transferencia se basa en índices morfológicos. Aunque exitoso, el campo de la tecnología de reproducción asistida se beneficiaría de un método cuantitativo no invasivo para la determinación de la viabilidad. Las técnicas ómicas, incluidas la transcriptómica, proteómica y metabolómica, han empezado a proporcionar evidencia de que los gametos y embriones viables poseen perfiles moleculares únicos con biomarcadores potenciales que pueden utilizarse para la selección del desarrollo, de la viabilidad, o de ambas. A diferencia del genoma humano que es relativamente fijo y estable en todo el cuerpo humano, el proteoma humano, estimado en más de un millón de proteínas, es más complejo, diverso y dinámico. Las proteínas en sí mismas contribuyen a la homeostasia fisiológica de cualquier célula o tejido. De interés particular en la tecnología de reproducción asistida es el secretoma, las proteínas producidas dentro del embrión y secretadas en el ambiente circundante. La definición del secretoma embrionario humano tiene el potencial de expandir nuestro conocimiento de los procesos celulares embrionarios, incluido el complejo diálogo entre el embrión en desarrollo y su ambiente materno, y también puede ayudar en la identificación de los embriones con mayor potencial de implantación. Los avances en las técnicas proteómicas han permitido la caracterización no invasiva del secretoma embrionario humano con la investigación en curso enfocada en la correlación con el resultado. Desde una perspectiva clínica, la selección de embriones basada en la evaluación morfológica y el análisis no invasivo del secretoma embrionario humano puede aumentar el éxito de la FIV y resultar en la transferencia rutinaria de embriones individuales.

**Palabras clave:** proteómica, embrión, secretoma, evaluación no invasiva.

### ABSTRACT

Non-invasive gamete and embryo assessment is considered an important focus in assisted reproductive technologies (ART). Currently, the selection of embryos for transfer is based on morphological indices. Though successful, the field of ART would benefit from a non-invasive quantitative method of viability determination. Omics technologies, including transcriptomics, proteomics and metabolomics, have already begun providing evidence that viable gametes and embryos possess unique molecular profiles with potential biomarkers that can be utilized for developmental and/or viability selection. Unlike the human genome that is relatively fixed and steady throughout the human body, the human proteome, estimated at over a million proteins, is more complex, diverse and dynamic. It is the proteins themselves that contribute to the physiological homeostasis in any cell or tissue. Of particular interest in ART is the secretome, those proteins that are produced within the embryo and secreted into the surrounding environment. Defining the human embryonic secretome has the potential to expand our knowledge of embryonic cellular processes, including the complex dialogue between the developing embryo and its maternal environment, and may also assist in identifying those embryos with the highest implantation potential. Advances in proteomic technologies have allowed the non-invasive profiling of the human embryonic secretome with ongoing research focused on correlation with outcome. From a clinical perspective, embryo selection based on morphological assessment and non-invasive analysis of the human embryonic secretome may improve IVF success and lead to routine single embryo transfers.

**Key words:** proteomics, embryo, secretome, non-invasive assessment.

**D**urante la década pasada, ha habido un gran enfoque en la caracterización molecular de diversos sistemas biológicos y estados de enfermedad. El genoma humano consta de ~25,000 genes y el transcriptoma humano proporciona a los investigadores datos valiosos sobre la expresión genética. Sin embargo, el proteoma humano –definido como el complemento PROteico del genOMA humano– dicta en realidad la función celular y determina en última instancia el fenotipo (Figura 1). Por sí mismo el proteoma es dinámico, cambia constantemente mediante sus propias interacciones, afectado por estímulos internos y externos. Los avances en las técnicas proteómicas han empezado a arrojar luz sobre la diversidad y complejidad del proteoma humano, estimado en más de un millón de proteínas. Una variedad de muestras biológicas está bajo investigación, con insistencia en la identificación de proteínas implicadas en estados de enfermedad específicos, a fin de desarrollar nuevas pruebas diagnósticas y pronósticas.<sup>1</sup> De particular interés para los investigadores es el secretoma, las proteínas producidas por células y secretadas en cualquier momento o bajo ciertas condiciones fisiológicas.<sup>2</sup> Diversos tipos de fluidos biológicos, incluido el suero y un medio acondicionado, se han analizado en busca de proteínas secretadas que puedan definir un estado particular de enfermedad o progresión.<sup>3,4</sup> A partir del análisis de proteomas séricos de una variedad de pacientes con cáncer se descubrió una serie de biomarcadores sustitutos del cáncer. Aunque muy prometedores, algunos de los biomarcadores aptos son relativamente abundantes, compartidos entre diferentes cánceres humanos y sobreexpresados en otras enfermedades humanas, como las autoinmunitarias.<sup>3</sup> Es fundamental la validación futura de los biomarcadores oncológicos aptos en grandes cohortes independientes de pacientes. Con el desarrollo de nuevas técnicas proteómicas sensibles, los investigadores se están concentrando en el descubrimiento de proteínas séricas

poco abundantes que son más sensibles y específicas del cáncer. En esta revisión se discute el papel de la proteómica en el estudio del secretoma embrionario de mamíferos. La definición y caracterización del secretoma embrionario de mamífero ampliará nuestro conocimiento de la embriogénesis temprana, promoverá nuestra comprensión del papel embrionario durante la implantación y contribuirá potencialmente al desarrollo de una evaluación no invasiva de viabilidad.

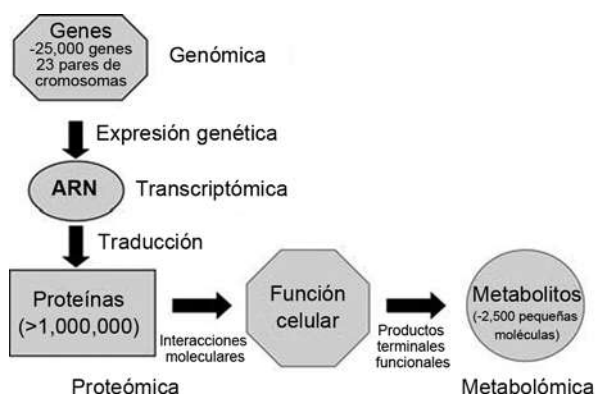
## EVALUACIÓN EMBRIONARIA

Actualmente, la selección de embriones para transferencia se basa en criterios morfológicos detallados.<sup>5</sup> Aunque relativamente exitoso, el campo de la tecnología de reproducción asistida se beneficiaría de más métodos cuantitativos de determinación de la viabilidad para aumentar el éxito de la FIV y disminuir la incidencia de embarazos múltiples.<sup>6</sup> Durante la década pasada, una disminución en la cantidad de embriones para transferencia se ha correlacionado con una reducción significativa de embarazos de orden superior.<sup>7</sup> Sin embargo, los embarazos gemelares continúan reflejando un alto porcentaje de embarazos por FIV con elevados riesgos para la salud de la madre y los fetos, que incluyen parto prematuro, bajo peso al nacimiento, mortalidad perinatal y otras complicaciones relacionadas con el embarazo.<sup>8</sup> Por consiguiente, la promesa de mejorar las tasas de embarazo por FIV con más métodos cuantitativos de selección embrionaria tiene la capacidad de optimizar la transferencia exitosa de embriones individuales.

## PROTEÓMICA Y EL EMBRIÓN MAMÍFERO

Las proteínas traducidas a partir de transcripciones de ARN son directamente responsables de la función celular como se ilustra en la Figura 1. Aunque valiosos, se ha demostrado que los estudios de expresión genética de estas transcripciones de ARN a menudo no predicen la abundancia de las proteínas o su función. Por ejemplo, en un estudio en células madre embrionarias –en el que se investigaron comparaciones pares de cambios en el ARNm y los niveles de expresión de proteína– se observaron bajos niveles de correlación.<sup>9</sup> Además, al examinar la relación entre las proteínas y la abundancia

\* Traducido de: Katz Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Reprod Hum Mol* 2009;15(5):271-277.



**Figura 1.** Diagrama esquemático que esboza la complejidad de la función celular incluidas las técnicas ómicas asociadas: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica que contribuyen al estudio y comprensión de los sistemas biológicos.

de ARNm en levaduras, se encontró que el análisis de transcripciones de ARNm era insuficiente para predecir la expresión proteica.<sup>10</sup> Varios mecanismos, incluida la degradación dirigida de ARNm y de proteína, pueden ser utilizados por la célula durante la regulación de la transcripción-traducción, lo que resulta en falta de asociación entre la expresión genética, las transcripciones de ARN y la expresión proteica. En consecuencia, es vital una investigación a fondo del proteoma humano para entender la función celular y comprender los procesos biológicos y los estados de enfermedad.

A pesar de los nuevos avances en las técnicas proteómicas, el conocimiento del proteoma de embriones mamíferos de preimplantación sigue siendo limitado. El efecto combinado de una plantilla limitada, baja expresión proteica y la falta de sensibilidad de las plataformas proteómicas han contribuido como los obstáculos principales. A pesar de estos obstáculos, ha habido algunas excelentes publicaciones, de las cuales se describe una selección en el Cuadro 1. Los estudios proteómicos tempranos utilizaron electroforesis bidimensional (2D) en gel en combinación con el análisis computarizado de imágenes en gel para construir y analizar las bases de datos de proteínas de embriones de ratón en fase de preimplantación.<sup>11,12</sup> La técnica de Western blot también se ha utilizado para identificar la expresión de proteínas conocidas,<sup>13</sup> o para detectar modificaciones postranscripcionales, como la fosforilación, relacionadas con el

desarrollo del embrión.<sup>14</sup> Recientemente, los avances en las técnicas proteómicas, con el desarrollo de la espectrometría de masa, han hecho posible identificar grupos de proteínas dentro de cantidades limitadas de fluidos biológicos y tejidos complejos.<sup>15,16</sup>

## ESPECTROMETRÍA DE MASA: UNA HERRAMIENTA PODEROSA EN LA PROTEÓMICA GLOBAL

La espectrometría de masa se ha convertido rápidamente en una tecnología importante en la caracterización proteómica. La búsqueda de una alteración consistente y significativa en el perfil de expresión proteica entre grupos específicos de muestras ha revelado características importantes de un estado de enfermedad o de un proceso fisiológico. La espectrometría de masa supone una fuente de iones para la producción de especies cargadas en la fase gaseosa, y un analizador, que pueda separar iones de acuerdo con su proporción masa-carga ( $m/z$ ). Algunos métodos de ionización utilizados comúnmente incluyen la ionización por electrospray y la ionización-desorción láser de superficie (SELDI, por sus siglas en inglés), las cuales están acopladas a analizadores de “tiempo de vuelo” (TOF, por sus siglas en inglés), trampa de iones o cuadrupole. La espectrometría de masa SELDI-TOF, con chips de captura específica de afinidad a proteínas, permite el análisis rápido, costo-efectivo y de alto rendimiento de volúmenes pequeños de muestras (rango de microlitros) y permite que la sensibilidad esté en el rango de picomoles a femtomoles. Las proteínas ligadas son activadas con láser liberando de este modo iones gaseosos mediante desorción-ionización. El tubo TOF está bajo un vacío el cual causa que los iones más pequeños viajen más rápido hacia el detector permitiendo de este modo la separación de estos iones de acuerdo con la proporción  $m/z$  representada como un perfil de proteína.<sup>17</sup> La tecnología se ha aplicado a una serie de tejidos y fluidos biológicos con un especial enfoque en oncoproteómica, incluida la detección temprana, capacidad metastásica y resultado terapéutico de una variedad de diferentes cánceres.<sup>18</sup> La identificación de proteínas siguiendo el perfil de espectrometría de masa típicamente se realiza mediante digestión con proteasas generando diferentes productos de escisión identificables

**Cuadro 1.** Publicaciones seleccionadas que destacan el uso de la proteómica en la evaluación y desarrollo embrionario

<i>Modelo</i>	<i>Caracterización</i>	<i>Hallazgos clave</i>	<i>Referencia</i>
Ratón	Electroforesis 2D en gel	Se construyó una base de datos de proteínas en gel 2D para embrión de ratón. Se caracterizaron los cambios en los patrones de síntesis proteica durante el desarrollo normal de preimplantación desde la fertilización hasta el estadio de blastocisto	Latham y col. (1992) <sup>11</sup>
Ratón	Electroforesis 2D en gel	Se construyeron bases de datos de proteínas para embriones de ratón compactados de ocho células y en estadio de blastocisto. Se documentaron los cambios cuantitativos generales en las concentraciones de proteínas	Shi y col. (1994) <sup>12</sup>
Conejo	Western blot	En blastocistos de conejo se expresaron isoformas de proteína transportadora de glucosa sensible a insulina (GLUT4 y GLUT8) y proteína receptora de insulina	Navarrete Santos y col. (2004) <sup>13</sup>
Ratón	Western blot	El aumento en la fosforilación de SAPK/JNK y p38MAPK se correlacionó negativamente con el desarrollo del embrión de ratón	Wang y col. (2005) <sup>14</sup>
Porcino	EM MALDI-TOF Western blot	La proteína vault mayor (MVP) se acumuló en embriones que no se desarrollaron normalmente <i>in vitro</i>	Sutovsky y col. (2005) <sup>20</sup>
Ratón	EM SELDI-TOF	Los embriones que generaron por debajo de 5% (bajo) de oxígeno fueron más parecidos a embriones de ratón derivados <i>in vivo</i> . Las condiciones con oxígeno alto (20%) se asociaron con la regulación a la baja de 10 proteínas-biomarcadores	Katz-Jaffe y col. (2005) <sup>21</sup>
Humano	EM SELDI-TOF	Se identificaron diferentes perfiles proteicos entre los blastocistos tempranos y expandidos, y entre blastocistos en desarrollo y embriones en degeneración	Katz-Jaffe y col. (2006a) <sup>22</sup>

SAPK/JNK: proteína cinasa activada por estrés-cinasa Jun; p38 MAPK: proteína cinasa mitógeno-activada 38; EM MALDI-TOF: espectrometría de masa de desorción-ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo; EM SELDI-TOF: espectrometría de masa de ionización-desorción láser de superficie-tiempo de vuelo.

con el análisis de espectrometría de masa en tándem y la búsqueda en la base de datos de proteínas.<sup>19</sup>

Ha comenzado a utilizarse la tecnología de espectrometría de masa como una plataforma proteómica en el estudio del desarrollo del embrión de preimplantación (Cuadro 1). La proteína vault mayor (MVP, por sus siglas en inglés) se identificó como una proteína expresada en embriones de preimplantación porcinos utilizando espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) y Western blot. Se demostró que la MVP se acumulaba en embriones porcinos de baja calidad que no se desarrollaron normalmente *in vitro*.<sup>20</sup> Además, recientemente la espectrometría de masa SELDI-TOF

se ha utilizado para generar perfiles proteicos en todos los estadios del desarrollo embrionario de mamíferos.<sup>21,22</sup> Se observaron diferencias en los perfiles proteicos entre blastocistos tempranos y expandidos, así como entre blastocistos en desarrollo y embriones degenerados. La búsqueda preliminar en la base de datos identificó algunos de los candidatos proteicos que podrían estar directamente vinculados con la embriogénesis.<sup>22</sup>

Necesita considerarse la naturaleza dinámica y sensible del proteoma a variables durante la recolección, almacenamiento, manejo y procesamiento de la muestra, y un protocolo consistente necesita estar acompañado de datos proteómicos reproducibles.<sup>23</sup> El prejuicio de los datos causado por la calibración de la espectrometría

de masa y la corriente del instrumento a lo largo del tiempo y entre laboratorios también puede introducir artefactos. Esto puede controlarse corriendo muestras en repeticiones, realizando habitualmente calibraciones internas y externas e incluyendo muestras adecuadas de control con cada serie.

## EL SECRETOMA EMBRIONARIO

Se propone que los embriones viables poseen un proteoma único con algunas de estas proteínas secretadas en el medio de cultivo circundante contribuyendo potencialmente al secretoma. En consecuencia, un análisis proteómico no invasivo del secretoma de embriones mamíferos a lo largo del desarrollo antes de la implantación puede ayudar a revelar los factores secretados que reflejan competencia y viabilidad de desarrollo.

Uno de los estudios más tempranos del secretoma embrionario humano reveló la liberación de 1-o-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina (paf), un factor soluble que es producido y secretado por embriones mamíferos de preimplantación. paf funciona de manera autocrina como un factor de supervivencia durante el desarrollo embrionario. También crea un espectro de alteraciones de la fisiología materna que incluyen activación plaquetaria.<sup>24</sup> La leptina, un pequeño péptido pleiotrópico, también se ha observado en el medio acondicionado de blastocistos en un modelo humano *in vitro* para estudiar las interacciones entre el embrión y las células epiteliales endometriales.<sup>25</sup> Se demostró que los blastocistos humanos competentes secretaron concentraciones de leptina en el medio circundante más altas que los embriones detenidos. Se ha planteado la hipótesis de que la leptina secretada por el blastocisto inicia un efecto ligando mediado por receptor con receptores de leptina en el endometrio materno estableciendo un diálogo molecular durante la ventana de implantación.<sup>26</sup>

Se ha demostrado que la acrogranina, una proteína que regula el crecimiento celular epitelial, es secretada en el medio circundante por embriones de ratón en preimplantación.<sup>27</sup> Una vez que se agregó acrogranina al medio de cultivo, se promovió la formación del blastocisto. Se cree que la acrogranina actúa directamente en las células trofoectodérmicas de forma autocrina. Además, este estudio reveló que la adición de anticuerpos

antiacrogranina al medio circundante retrasó el inicio de la formación del blastocisto. Se ha sugerido que la acrogranina es expresada por el útero e influye en el desarrollo embrionario de forma similar a la de la acrogranina agregada exógena que promueve la formación del blastocisto en cultivo.<sup>27</sup>

Recientemente, Sakkas y col.<sup>28</sup> caracterizaron una molécula soluble secretada por los blastocistos humanos que modula la regulación de la expresión de HOXA10 en una línea celular del epitelio endometrial. Esta forma de interacción recíproca embrio-endometrial podría transformar el ambiente uterino local afectando el desarrollo embrionario y el proceso de implantación. Además, la detección de antígeno G leucocitario humano soluble (sHLA-G, por sus siglas en inglés) en el medio de FIV de embriones en el día 3 ha indicado mayores tasas de embarazo en embriones positivos a sHLA-G.<sup>29,30</sup> Sin embargo, estos resultados no han sido absolutos con embarazos establecidos a partir de embriones negativos a sHLA-G. Asimismo, se han registrado diferencias técnicas que incluyen la incapacidad de medir la producción de sHLA-G en algunos sobrenadantes.<sup>31</sup> En general, cada uno de estos estudios individuales del secretoma se ha enfocado sólo en la variable individual. Al considerar la naturaleza multifactorial del desarrollo embrionario mamífero, sería razonable asumir que se requeriría más de un factor individual para predecir la competencia de desarrollo o el potencial de implantación (o ambos).

## ESPECTROMETRÍA DE MASA Y EL SECRETOMA EMBRIONARIO

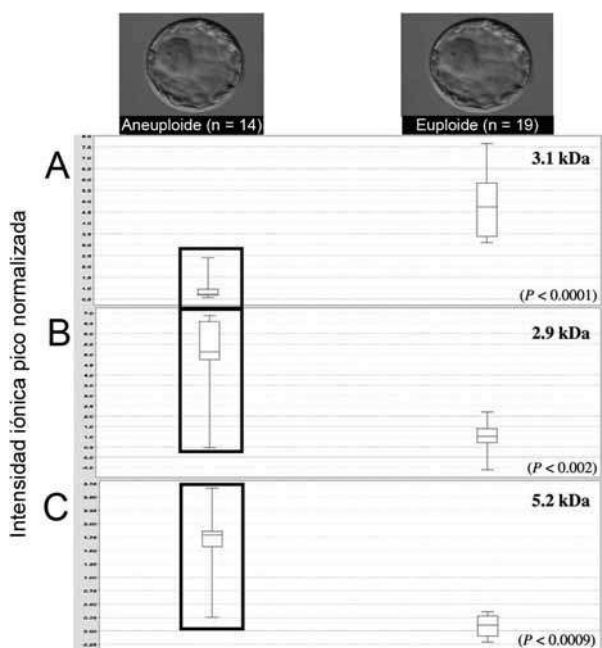
Con la espectrometría de masa SELDI-TOF, se observaron las firmas distintivas del secretoma cada 24 horas del desarrollo embrionario desde el momento de la fertilización hasta el estadio de blastocisto. Estas firmas del secretoma podrían identificar de forma única los estadios del desarrollo embrionario, independiente de la morfología. Se observaron algunas proteínas a lo largo de varios estadios embrionarios, mientras que otras fueron más estadio-específicas.<sup>32</sup> De manera interesante, la comparación de especies entre el secretoma de ratón y el humano reveló una diversidad limitada; similar a la de la proteína paf, la cual se ha observado en el secretoma de todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha.<sup>24</sup>

La transición desde transcripciones y proteínas maternas heredadas hasta la activación del genoma embrionario y la expresión de proteínas embrionarias clave debe ocurrir para el desarrollo embrionario continuo.<sup>33</sup> En particular, se observaron proteínas únicas en el secretoma embrionario después de la activación del genoma embrionario.<sup>32</sup> Así, los embriones con un genoma activado correctamente, y por tanto, un proteoma y secretoma embrionario completamente funcional pueden tener un mayor potencial de competencia de desarrollo. La correlación de las firmas del secretoma con el desarrollo en curso del blastocisto reveló una proteína de 8.5 kDa. La expresión limitada de esta proteína de 8.5 kDa a partir del secretoma de embriones en degeneración, en conjunto con su significativamente alta expresión a partir del secretoma de blastocistos en desarrollo, indica potencialmente una asociación entre esta proteína y la competencia de desarrollo ( $p < 0.05$ ). La espectrometría de masa en tándem y la base de datos de identificación de secuencias peptídicas indicaron que el mejor candidato para esta proteína de 8.5 kDa era la ubiquitina.<sup>32</sup> La ubiquitina es un componente del sistema proteosómico dependiente de ubiquitina, que identifica proteínas para degradación. El sistema está implicado en una serie de procesos fisiológicos que incluyen la proliferación y la apoptosis. Se ha demostrado que la ubiquitina secretada es estimulada en los fluidos corporales en ciertos estados de enfermedad y esta acumulación proporciona evidencia de un aumento en el recambio proteico.<sup>34,35</sup> La ubiquitina también se ha implicado en el desempeño de una papel decisivo durante la implantación en mamíferos mediante el control de las actividades y el recambio de moléculas clave en la señalización.<sup>36</sup> La investigación en curso está enfocada en la identificación de las proteínas restantes secretadas, así como la correlación con la competencia de desarrollo y la implantación.

Otro aspecto de las técnicas de reproducción asistida que podría beneficiarse del análisis no invasivo es la detección genética preimplantación (PGS, por sus siglas en inglés). La PGS implica la biopsia de cuerpos polares o células embrionarias y se ha convertido en un procedimiento clínico rutinario en muchas clínicas de FIV para la detección de anormalidades cromosómicas específicas en embriones humanos. Los procedimientos de biopsia son invasivos para el embrión en crecimiento

y podrían afectar potencialmente el desarrollo posterior. Una investigación inicial sobre si los embriones con anormalidades cromosómicas podrían distinguirse de embriones euploides mediante su respectivo secretoma identificó que blastocistos en incubación euploides para 10 cromosomas exhibieron perfiles de secretoma notablemente diferentes a los de blastocistos en incubación aneuploides para 10 cromosomas. Además, los embriones aneuploides en degeneración exhibieron un perfil de secretoma significativamente diferente al de blastocistos aneuploides en incubación.<sup>37</sup>

Con avances en las técnicas genómicas que permiten un análisis cromosómico exhaustivo de los 23 pares de cromosomas en una célula individual,<sup>38</sup> ha llegado a ser realista un abordaje “ómico” integrado, que discrimina las firmas de secretoma entre blastocistos euploides y aneuploides individuales. Se procesaron microgotas de medio de cultivo de FIV consumada de blastocistos individuales de calidad transferible ( $n = 33$ ) y se analizaron mediante espectrometría de masa SELDI-TOF determinando una huella digital del secretoma del blastocisto. Cada blastocisto individual se sometió a hibridación genómica comparativa para un análisis cromosómico exhaustivo de los 23 pares de cromosomas; con 19 identificados como euploides y 14 como aneuploides.<sup>38</sup> De los 14 blastocistos aneuploides, 9 tuvieron aneuploidía cromosómica única y 5 eran caóticos con más de dos cromosomas implicados. Las huellas digitales del secretoma de blastocistos individuales identificaron firmas proteicas que permitieron la discriminación entre constituciones cromosómicas euploides y aneuploides.<sup>39</sup> Después de un análisis estadístico, se identificó una nueva serie de nueve biomarcadores expresados de manera diferencial ( $p < 0.05$ ). Cada uno de los nueve biomarcadores fue reproducible en las 33 muestras de secretoma clasificando un secretoma-blastocisto euploide de un secretoma-blastocisto aneuploide.<sup>39</sup> La Figura 2 muestra cuadros de tres ejemplos de esta serie, incluido un biomarcador que mostró una expresión disminuida en el secretoma de blastocistos aneuploides ( $p < 0.05$ , Figura 2A), y dos biomarcadores que se demostró que tienen expresión aumentada en el secretoma de blastocistos aneuploides ( $p < 0.05$ , Figura 2B y C). La investigación en curso está enfocada en el aumento del tamaño de la muestra para confirmar la reproducibilidad, incluido



**Figura 2.** Ejemplos de biomarcadores que se expresaron diferencialmente en las firmas del secretoma de blastocistos euploides ( $n = 19$ ) comparados con el secretoma de blastocistos aneuploides ( $n = 14$ ) ( $p < 0.05$ ).

(A) Cuadro que revela disminución significativa en la expresión de un biomarcador de 3.1 kDa en el secretoma de blastocistos aneuploides comparados con el secretoma de blastocistos euploides ( $p < 0.0001$ ). (B y C) Dos cuadros que muestran aumento significativo en la expresión de biomarcadores de 2.9 y 5.2 kDa en el secretoma de blastocistos aneuploides comparados con el secretoma de blastocistos euploides ( $p < 0.002$  y  $p < 0.0009$ , respectivamente). El eje superior del cuadro indica el percentil 75, y el inferior, el percentil 25. La línea interna representa la mediana.

un análisis prospectivo para validar la discriminación de blastocistos euploides y aneuploides. La capacidad de analizar no invasivamente la combinación de la competencia de desarrollo y la constitución cromosómica podría representar una poderosa herramienta de selección de viabilidad en las técnicas de reproducción asistida.

## MICROARREGLO PROTEICO

Además de la tecnología de espectrometría de masa, existen otras plataformas proteómicas en investigación que parecen prometedoras para la definición del secretoma embrionario humano. En particular, los

microarreglos proteicos tienen la ventaja agregada de ofrecer información complementaria a los estudios del transcriptoma, así como eliminar la necesidad de identificación proteica de seguimiento. Recientemente, un estudio que utilizó microarreglos proteicos comparó el medio acondicionado de blastocistos agrupados con un medio de control y reveló el aumento en la expresión del receptor 1 de factor de necrosis tumoral soluble (TNF) e interleucina (IL) 10, y la disminución en la expresión de proteína estimulante de macrófagos (MSP) alfa, factor de células madre (SCF), quimiocina (C-X-C motif) ligando 13 (CXCL13), receptor 3 a ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAILR3) y proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) 1beta.<sup>40</sup> El análisis adicional que investigó las diferencias potenciales entre el medio acondicionado agrupado de blastocistos que se implantaron *versus* el medio agrupado que resultó en falla en la implantación reveló disminución significativa de dos proteínas, CSCL13 y GM-CSF, en el medio de blastocistos implantados. Se ha identificado que GM-CSF es una proteína que en medios de cultivo de blastocistos humanos y de ratón promueve el desarrollo embrionario y la implantación.<sup>41</sup> La disminución de la expresión de GM-CSF observada por Dominguez y col.<sup>40</sup> puede indicar un mecanismo autocrino en el mantenimiento del desarrollo del blastocisto y la implantación potencial. No se observó aumento significativo de ninguna de las 120 proteínas incluidas en este microarreglo proteico en el medio acondicionado de blastocistos implantados.<sup>40</sup> Las grandes cantidades de muestra requeridas y otras limitantes de sensibilidad de la plataforma restringieron el estudio a la investigación de muestras agrupadas en contraste con muestras de medios individuales. Otros asuntos relacionados con la plataforma incluyen el alto costo de los microarreglos proteicos, el bajo número de blancos en comparación con la espectrometría de masa u otras técnicas, y la dependencia de la existencia de anticuerpos e interacciones potenciales no específicas.<sup>42</sup>

## METABOLITOS EN EL SECRETOMA EMBRIONARIO HUMANO

Los metabolitos, productos funcionales finales de procesos biológicos, también están bajo investigación en el secretoma mediante métodos basados en espectroscopia

junto con bioinformática dirigida.<sup>43</sup> Se ha demostrado que estos metabolitos de bajo peso molecular cambian radicalmente para reflejar un estado metabólico y ambiental particular. La espectroscopia infrarroja cercana y la espectroscopia Raman son dos métodos que se han utilizado para detectar biomarcadores específicos del estrés oxidativo en un medio de cultivo agotado con diferencias destacadas en los algoritmos generados para resultados de FIV positivos *versus* negativos. Se observó que los índices de viabilidad generados a partir del análisis de medios de cultivo agotados fueron mayores para embriones humanos que avanzaron para producir embarazos y nacidos vivos, en comparación con los que no se implantaron.<sup>44</sup> Además, un estudio ciego piloto de datos recolectados retrospectivamente, que utilizaron la plataforma Raman de espectroscopia, reveló una precisión diagnóstica general de 80.5% para predecir el potencial reproductivo embrionario, el parto o la falla en la implantación.<sup>45</sup>

La proteómica y metabolómica son dos plataformas ómicas complementarias en la investigación del secretoma embrionario humano que son prometedoras para el desarrollo de métodos no invasivos de selección de embriones en el campo de las técnicas de reproducción

asistida. Con la capacidad de analizar proteínas y metabolitos en medios de cultivo agotados, lo que genera perfiles moleculares complementarios pero distintos, es factible proponer que la evaluación de viabilidad embrionaria puede incluir una combinación de ambas plataformas.

## DISCUSIÓN

Los avances en el campo de la proteómica, particularmente las mejoras en la detección de los instrumentos de espectrometría de masa, han hecho posible el análisis de fluidos biológicos complejos limitados, incluidos los medios de cultivo agotados, y han facilitado el análisis rápido, sensible y de alto rendimiento del secretoma. La investigación en curso del secretoma que utiliza una variedad de plataformas proteómicas continuará proporcionando datos valiosos que aumentarán nuestra comprensión de los procesos biológicos implicados en el desarrollo embrionario de mamíferos (Cuadro 2). Este conocimiento puede contribuir con la evaluación no invasiva de la viabilidad embrionaria para su uso en las técnicas de reproducción asistida. Junto con la morfología, un método cuantitativo no invasivo de selección embrionaria

**Cuadro 2.** Publicaciones seleccionadas que destacan el uso de la proteómica en la definición del secretoma embrionario

<i>Modelo</i>	<i>Caracterización</i>	<i>Hallazgos clave</i>	<i>Referencia</i>
Ratón	Western blot e inmunoprecipitación	La proteína acrogranina fue secretada por embriones en el medio circundante. La adición de acrogranina al medio de cultivo estimuló la formación del blastocisto. La adición de anticuerpos anti-acrogranina al medio de cultivo retrasó la formación del blastocisto	Díaz-Cueto y col. (2000) <sup>27</sup>
Humano	ELISA	Los blastocistos competentes secretaron concentraciones más altas de leptina que los embriones detenidos	González y col. (2000) <sup>25</sup>
Humano	ELISA	La detección del antígeno leucocitario humano soluble G (sHLA-G) en el medio agotado de FIV tuvo una correlación positiva con el resultado de embarazo	Noci y col. (2005) <sup>29</sup> y Sher y col. (2005) <sup>30</sup>
Humano-ratón	EM SELDI-TOF	Se identificaron diferentes perfiles de secretoma para cada estadio del desarrollo embrionario. La ubiquitina, una proteína de 8.5 kDa, fue estimulada en el secretoma de blastocistos en el día 5 de desarrollo	Katz-Jaffe y col. (2006b) <sup>32</sup>
Humano	Microarreglo proteico	Expresión aumentada de receptor 1 de TNF soluble e IL-10, y expresión disminuida de MSP-alfa, SCF, CXCL13, TRAILR3 y MIP-1beta en medio de cultivo de blastocistos. El medio de blastocistos implantados mostró una expresión disminuida de CSCL13 y GM-CSF	Domínguez y col. (2008) <sup>40</sup>

ELISA: ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas; TNF: factor de necrosis tumoral.



puede optimizar las transferencias exitosas de embriones individuales, reducir las pérdidas tempranas del embarazo y aumentar la cantidad de nacidos vivos. La definición del secretoma embrionario también proporcionará a los investigadores una visión de las secuencias únicas de eventos que son fundamentales para la implantación exitosa, incluidos los requerimientos más críticos del blastocisto. Si se toma en cuenta la complejidad y diversidad del embrión humano, parece razonable prever una contribución “ómica” combinada con la caracterización del secretoma embrionario humano.

### Financiamiento

El financiamiento para pagar los gastos de publicación de Acceso Abierto para este artículo fue proporcionado por BioSymposia Inc.

*Traducción: Adriana Jardón A*

### REFERENCIAS

- Dominguez DC, Lopes R, Torres ML. Proteomics: clinical applications. *Clin Lab Sci* 2007;20:245-248.
- Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics* 2007;4:239-248.
- Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 2006;6:6326-6353.
- Kulasingam V, Diamandis EP. Proteomics analysis of conditioned media from three breast cell lines: a mine for biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1997-2011.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003;9:251-262.
- Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:283-288.
- Stern JE, Cedars MI, Jain T, Klein NA, et al. Assisted reproductive technology practice patterns and the impact of embryo transfer guidelines in the United States. *Fertil Steril* 2007;88:275-282.
- Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update* 2005;11:575-593.
- Williamson AJ, Smith DL, Blinco D, Unwin RD, et al. Quantitative proteomics analysis demonstrates post-transcriptional regulation of embryonic stem cell differentiation to hematopoiesis. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:459-472.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720-1730.
- Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Analysis of embryonic mouse development: construction of a high-resolution, two-dimensional gel protein database. *Appl Theor Electrophor* 1992;2:163-170.
- Shi CZ, Collins HW, Garside WT, Buettger CW, et al. Protein databases for compacted eight-cell and blastocyst-stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1994;37:34-47.
- Navarrete Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 2004;128:503-516.
- Wang Y, Puscheck EE, Lewis JJ, Trostinskaia AB, et al. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertil Steril* 2005;1:1144-1154.
- Gutstein HB, Morris JS, Annangudi SP, Sweedler JV. Micro-proteomics: analysis of protein diversity in small samples. *Mass Spectrom Rev* 2008;27:316-330.
- Jansen C, Hebeda KM, Linkels M, Grefte JM, et al. Protein profiling of B-cell lymphomas using tissue biopsies: A potential tool for small samples in pathology. *Cell Oncol* 2008;30:27-38.
- Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, Meuer J. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Pathol Res Pract* 2004;200:83-94.
- Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2007;6:25.
- Liebler DC. Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. New Jersey: Humana Press; 2002.
- Sutovsky P, Manandhar G, Laurincik J, Letko J, et al. Expression and proteasomal degradation of the major vault protein (MVP) in mammalian oocytes and zygotes. *Reproduction* 2005;129:269-282.
- Katz-Jaffe MG, Linck DW, Schoolcraft WB, Gardner DK. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction* 2005;130:899-905.
- Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006a;85:101-107.
- Hu J, Coombes KR, Morris JS, Baggerly KA. The importance of experimental design in proteomic mass spectrometry experiments: some cautionary tales. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005;3:322-331.
- O'Neill C. The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update* 2005;11:215-228.
- Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4883-4888.
- Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simon C. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 2005;10:217-223.
- Díaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol* 2000;217:406-418.

28. Sakkas D, Lu C, Zulfikaroglu E, Neuber E, Taylor HS. A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line. *Fertil Steril* 2003;80:1169-1174.
29. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138-146.
30. Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, et al. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2005;83:1410-1413.
31. Sargent I, Swales A, Ledee N, Kozma N, et al. sHLA-G production by human IVF embryos: can it be measured reliably? *J Reprod Immunol* 2007;75:128-132.
32. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86:678-685.
33. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;26:90-100.
34. Sandoval JA, Hoelz DJ, Woodruff HA, Powell RL, et al. Novel peptides secreted from human neuroblastoma: useful clinical tools? *J Pediatr Surg* 2006;41:245-251.
35. Delbosc S, Haloui M, Louedec L, Dupuis M, et al. Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. *Mol Med* 2008;14:383-394.
36. Wang HM, Zhang X, Qian D, Lin HY, et al. Effect of ubiquitin-proteasome pathway on mouse blastocyst implantation and expression of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biol Reprod* 2004;70:481-487.
37. Katz-Jaffe MG, Stevens J, Kearns WG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Relationship between embryonic secretome and chromosomal abnormalities in human IVF. *Fertil Steril* 2006;86:S57.
38. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe MG, et al. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008;23:2596-2608.
39. Katz-Jaffe MG, Fagouli E, Philippovits J, Wells D, Schoolcraft WB. Relationship between the human blastocyst secretome and chromosomal constitution. *Fertil Steril* 2008;90:S80.
40. Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, et al. Comparative protein-profile analysis of implanted *versus* non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008;23:1993-2000.
41. Robertson SA. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:287-298.
42. Spisak S, Tulassay Z, Molnar B, Guttman A. Protein microchips in biomedicine and biomarker discovery. *Electrophoresis* 2007;28:4261-4273.
43. Brison DR, Hollywood K, Arneson R, Goodacre R. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online* 2007;15:296-302.
44. Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;88:1350-1357.
45. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, et al. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008;90:77-83.